新しい骨髄移植方法を用いた難病の治療

池 原 進

Jpn. J. Clin. Immun., 25 (1) : 7~13, 2002.

Treatment of intractable diseases by a new bone marrow transplantation method

Susumu Ikehara

*First Department of Pahtology, Transplantation Center,
Regeneration Research Center for Intractable Disease, Kansai Medical University*

Key words : autoimmune disease,
bone marrow transplantation,
hemopoietic stem cell,
mesenchymal stem cell,
intra-bone marrow injection

I. はじめに

骨髄移植 (BMT) は白血病, 再生不良性貧血等の造血系疾患や先天性免疫不全症, 先天的な代謝異常症の治療方法として目覚ましい効果を挙げている。厚生労働省指定の難病のほとんどは, 免疫が病因に何らかの形で関与しているものと考えられる。

筆者らは17年前から, 全身性エリテマトーデス (SLE) や慢性関節リウマチ (RA), 若年性糖尿病 (IDDM) などの自己免疫疾患を自然発症するマウスを用いて, 病気の発症した自己免疫マウスに, 正常マウスの骨髄を移植すると, 病気が治療できることを発見した¹⁾。

1995年頃から欧米では自己免疫疾患の治療が主目的の骨髄移植が開始されるようになり, すでに500例以上にもおよぶ難治性の自己免疫疾患の患者に対して骨髄移植が施行されている。筆者らは, ヒトで骨髄移植を安全に施行するための基本的条件を明らかにし,

自己免疫疾患を含めた種々の難病を骨髄移植により治療したいと考えて研究して来た。最近, 新しい骨髄移植の方法を開発したので, その方法も含めて紹介する。

II. BMTによるSLEの治療

筆者らはSLEを自然発症する種々のモデルマウスを用いて, 正常マウスの骨髄を移植することによってSLEが治療できることを発見した¹⁾。異系マウスの骨髄を移植に用いたが, これはヒトへの応用の場合, 遺伝性素因のある自己免疫疾患では, 遺伝的背景を有する同胞の骨髄よりも, 正常な他人の骨髄の使用が好ましいと考えられるからである。

以下BMT後の所見を要約すると,

① BMT 3カ月後には, 退縮していた胸腺が回復する。② 血清学的にもBMT後, 抗DNA抗体などの自己抗体や血中の免疫複合体が著明に減少する。③ BMT後, ループス腎炎の像 (腎糸球体の免疫グロブリン, 補体の沈着) が改善される。このように, 正常の骨髄を移植することにより, SLEを治療できるこ

とが明らかになった¹⁾。

III. BMT による糖尿病の予防並びに治療

臓器特異的自己免疫疾患の1つであるI型糖尿病 (IDDM) のモデルマウス NOD を用いて BMT を行った。すでに膵島炎を発症している NOD マウスに正常マウスの骨髄を移植した。BMT 後3カ月して屠殺前に耐糖能を調べたが、糖尿病のパターンは示さず、膵島炎は認められず、 β 細胞の存在が確認された²⁾。

すでに β 細胞が完全に破壊されてしまった NOD マウスでは、BMT だけでは治療できず、BMT と膵移植の併用による治療を試みた。筆者らは、以前、肝移植の際に BMT を併用すると移植片が拒絶されないということを証明しており³⁾、この方法を応用して、BMT と同時に骨髄 donor と同系マウスの胎仔の膵を腎被膜下に移植した。この処置を受けた NOD マウスは、尿糖、血糖値も漸時低下した。膵移植片は、腎被膜下に生着しており、酵素抗体法により、インスリン産生細胞 (β 細胞) の存在が確認できた⁴⁾。

次に、II型糖尿病 (NIDDM) の中でも免疫学的異常が関与しているものが存在するのではないかと考え、II型糖尿病のモデルマウス、KK-Ay を用いて BMT による NIDDM の治療を試みた。尿糖が強陽性の KK-Ay/Ta (H-2b) マウスに、正常マウスの骨髄細胞を移植した。正常 BALB/c マウスの骨髄を移植した群では、正常の GTT パターンを示し、糖尿病は BMT のみ (膵移植なしで) 治療できることが判明した⁵⁾。

以上の結果から、II型の糖尿病も何らかの免疫学的異常により発症し、正常マウスの骨髄を移植することにより、膵移植なしに治療が可能であるものが存在すると考えられる。さらに、糖尿病の発症に伴って出現してくる高脂血症、糖尿病性腎症も BMT により治療可能であることが、明らかになった⁶⁾。

IV. BMT による慢性腎炎の治療

慢性腎炎の中でも、巣状分節性糸球体硬化症 (FGS) は、ステロイドホルモンや免疫抑制剤に抵抗性で、予後不良とされている。

FGS のモデルマウスを用いて、FGS の病因と治療法を検討した。蛋白尿が強陽性 (+++) の FGS マウスに、正常マウスの骨髄を移植すると、移植後6週より蛋白尿が次第に減少し始め、移植3カ月後には、尿蛋白が痕跡程度まで改善した。腎の生検でも、光顕

所見のみならず、蛍光抗体の所見でも、腎病変が改善されることが確認された。

次に、FGS 病変を正常マウスに移入するため、FGS マウスの部分精製した造血幹細胞を正常マウスに移植した所、3カ月後には、高度の蛋白尿 (+++) を示すようになり、組織学的にも FGS 様の糸球体病変が認められた。このように、FGS マウスの異常な造血幹細胞を正常マウスに移植することによって、正常マウスに FGS を発症させ得ることに成功した⁶⁾。以上の事実は、FGS は臓器 (腎) 特異的自己免疫疾患であり、造血幹細胞の異常に起因することを物語っている。

これまでのモデルマウスを用いた詳細な実験結果に関しては、個々の文献または筆者の英文の review⁷⁾ を参考にしていただきたい。

V. 骨髄移植成功の鍵を握る3種類の細胞

種々のモデル動物を用いて正常の骨髄を移植することにより、種々の自己免疫疾患を予防ならびに治療できることが明らかになったが、RA と SLE を自然発症する MRL/lpr マウス (Fas gene の defects が存在) では、放射線に感受性であるため、8.5 Gy 以上の放射線照射ができず、正常マウスの骨髄を移植しても、3カ月以降には、自己免疫疾患が再発してくることが判明した⁸⁾。この MRL/lpr マウスの自己免疫疾患を BMT により根治するための方法論を模索し、3種類の細胞 (① 多能性造血幹細胞⁹⁾、② natural suppressor cells¹⁰⁾、③ ストローマ細胞 (間葉系幹細胞) が必要であることが判明した¹¹⁾。

筆者らは、多能性造血幹細胞を精製する方法を開発し、造血幹細胞の分化、増殖を in vitro で解析した結果、多能性造血幹細胞が増殖分化するためには、骨髄の微小環境構成細胞 (ストローマ細胞) が必須であることを明らかにした。さらに、BMT の際、造血幹細胞とストローマ細胞 (間葉系幹細胞) との主要組織適合複合遺伝子 (MHC) の特に class I が一致していると、造血幹細胞の増殖率が高いことが判明した¹²⁾。

VI. ドナーのストローマ細胞の補充方法

以上の結果より、BMT の際、造血幹細胞だけでなく、donor 由来のストローマ細胞の補充が必要と考え、骨髄微小環境構成細胞であるストローマ細胞も donor 側と置換する目的で、まず、骨を皮下に移植し、骨髄細胞を静注した (図1)。8.5 Gy 放射線照射

図1 骨髄ならびに骨移植の方法

ドナー (B6) のストローマ細胞 (間葉系幹細胞を含む) を補充する目的で、B6 の骨を皮下に移植すると、移植されたストローマ細胞から造血幹細胞を呼び寄せる液性因子が分泌されるため、ドナーの造血幹細胞が移植骨へ集まり、そこでドナー由来の造血幹細胞とストローマ細胞が増殖し、さらに MRL/lpr マウスの骨髄へ移動する。その結果 MRL/lpr マウスの骨髄は造血細胞のみならず、ストローマ細胞もドナー側の細胞に置換される。

し、骨と骨髄を同時に移植した群では、1 年近く経過しても再発せず 100% の生存率を示し、MRL/lpr マウスの自己免疫疾患の予防に成功した¹¹⁾。

しかしながら、MRL/lpr マウスは、自己免疫疾患発症後 (尿毒症性腸炎が発症するため)、放射線により感受性が強くなるため、8.5 Gy の放射線には耐えられず、2 週間以内に全例死亡することが明らかになった。そこで、MRL/lpr マウスの自己免疫疾患の治療法を検討し、放射線の分割照射 (5 Gy×2) と 2 回の BMT (T 細胞を除去せずに全骨髄細胞を移植) と骨移植と cyclophosphamide を使用することによって 90% 以上の生存率を得ることに成功した¹³⁾。

一般に、抗原を門脈より投与するとトレランスが誘導され易いということが良く知られている。筆者も、最近、donor の骨髄細胞を門脈 (P.V.) より、肝臓へ直接注入すると免疫学的寛容が誘導され易いことを見出した¹⁴⁾。これは、多能性造血幹細胞自身がホストの CD8⁺ キラー細胞を anergy に陥らしめることに依ると考えられる¹⁵⁾。そこで、骨髄細胞を P.V. より投与し、MRL/lpr マウスの自己免疫疾患の治療を

試みた。図2に示したように、正常マウスの骨髄細胞を p.v. 投与と i.v. の追加投与をすることにより、MRL/lpr マウスの自己免疫疾患が 100% 治療可能となった¹⁶⁾。この門脈内骨髄移植 (PV-BMT) が、どうして従来の静脈内骨髄移植 (IV-BMT) に比較して、効果があるかを解析した結果、PV-BMT においては、donor の造血幹細胞のみならずストローマ細胞も肝に trap されるため、donor のストローマ細胞が donor の造血幹細胞の増殖分化を効率良く support できることに依るということが明らかになった¹⁷⁾。それでは、髄外造血として肝で造血を起すよりは、骨髄細胞を骨髄内へ直接注入する方が、より効果があるのではないかと考えて次のような方法を開発した。

VII. 骨髄内骨髄細胞移植 (IBM-BMT) と新しい骨髄細胞採取方法

骨髄内 (Intra-bone marrow: IBM) へ全骨髄細胞 (少量の T 細胞とストローマ細胞を含む) を移植すると donor のストローマ細胞が donor の造血幹細胞を効率良く support できるため、donor の造血系並び

図 2 MRL/lpr マウスにおける難治性自己免疫疾患の治療方法

経門脈投与を用いて 5.5 Gy 2 回分割照射後、正常マウスの全骨髄細胞を門脈 (P.V.) から投与し、5 日後に静脈 (I.V.) から追加投与すると 100% の生存率が得られている。

図 3 “IBM-BMT” を用いた MRL/lpr マウスの自己免疫疾患の治療

“IBM-BMT” (骨髄内骨髓移植) では、放射線照射量を 5 Gy×2 に下げて 1 回の “IBM-BMT” で MRL/lpr マウスの自己免疫疾患を 100% 治療できる。

にリンパ系細胞の回復が速やかで、放射線量を 5.5 Gy×2 から 5 Gy×2 まで減量しても生着不全が起こらないことが明らかとなった¹⁸⁾ (図 3)。

この “IBM-BMT” をヒトへ応用するため、モンキーを用いた実験を開始し、まず、骨髄細胞の新しい

採取方法を開発した。従来の腸骨よりの吸引法では、末梢血が混入するため、採取骨髄細胞中に 20% 以上 T 細胞が含まれる。そのため T 細胞を除去しないと GvHD が発症する。そこで、マウスと同様に長管骨を用いて、灌流法を考案した (図 4)¹⁹⁾。これは、骨

図4 新しい骨髄採取方法（灌流法）

髄穿刺針を長管骨に2箇所挿入し、一方より生食を注入し、他方より骨髄細胞を採取するもので、短時間に大量の骨髄細胞を安全に採取できる。末梢血の混入がないため、T細胞も5%以下で、T細胞を除去しなくてもGvHDが発症しないことも明らかになった。それ故、採取全骨髄細胞を骨髄内へ注入することによって骨髄中の間葉系幹細胞も骨髄内へ効率良く移植が可能となる。

VIII. BMTによるヒト自己免疫疾患の治療

前述のように、ヒトでもBMTにより自己免疫疾患が治療できるということが明らかになったので²⁰⁾、治療抵抗性で進行性の自己免疫疾患に対しては、BMTを実施しようという国際的な動きが、7年前より活発となり、とりあえず、GVH反応の起こらないautoのBMTや自己の末梢血幹細胞移植(PBSCT)が開始された^{21~23)}。これは、動物実験でも、抗原投与により誘導される自己免疫疾患では、syngeneicのBMTによっても病気が改善されているからである^{24,25)}。しかしながら、抗原で誘導される自己免疫疾患と自然発症の自己免疫疾患とは、病因が根本的に異なり、前者は抗原によって誘導される、autor-

eactiveなT細胞、B細胞、抗原提示細胞の一時的な増殖によって病気が発症してくるものであって、造血幹細胞の異常に起因するものではない。そのため、抗原の消滅またはBMTの際の放射線照射により、autoreactiveな免疫担当細胞が除去されることによって病変の進行が抑制されるものと考えられる。しかしながら、後者（自然発症の場合）は、既述のように、造血幹細胞の異常に起因するため、autoのBMTでは、再発をまぬがれない。実際、ヒトでもautoのBMTによって自己免疫疾患の早期再発例の報告も見られ²⁶⁾、筆者らが、報告して来たように、ヒトの自己免疫疾患の治療としては、アロのBMT、特に同胞からの移植よりも、unrelated donorsからの移植が推奨される⁷⁾。

IX. おわりに

HLAのバリアーを超えたヒトの造血幹細胞移植の最大の問題点であるGvHDの予防に関しては、筆者らの開発した灌流法を用いて骨髄を採取することでクリアーできる。第2の問題点である生着不全(HvGR)に関しては、ドナーのストローマ細胞を造血幹細胞と一緒に骨髄内へ直接移植("IBM-

BMT”)することにより、ドナーの造血幹細胞の増殖、分化を促進することができる。さらに、骨髓中に本来存在する少量のT細胞(末梢のT細胞とは質的にも異なると考えられている)と一緒に移植することにより、生着不全が回避できる。第3の問題点であるT細胞機能の回復が不完全であるという点に関しても、ドナーのストローマ細胞を移植すると、この骨髓中の

ストローマ細胞が胸腺へ移住し、thymic nurse cellとしてpositive selectionに関与しているため、T細胞の機能も完全に回復してくることを筆者らは最近見出している²⁷⁾。それ故、灌流法を用いた“IBM-BMT”はこれまでの骨髓移植方法に代わる画期的な方法で種々の難病の治療方法として役立つものと確信している。

文 献

- 1) Ikehara, S., et al. : Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 2483~2487, 1985.
- 2) Ikehara, S., et al. : Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 7743~7747, 1985.
- 3) Nakamura, N., et al. : Successful liver allografts in mice by combination with allogeneic bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 4529~4532, 1986.
- 4) Yasumizu, R., et al. : Treatment of type I diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transplantation of allogeneic bone marrow and pancreatic tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 6555~6557, 1987.
- 5) Soe Than, et al. : Bone marrow transplantation as a strategy for treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK-Ay mice. *J. Exp. Med.* 176 : 1233~1238, 1992.
- 6) Nishimura, M., et al. : Focal segmental glomerular sclerosis, a type of intractable chronic glomerulonephritis, is a stem cell disorder. *J. Exp. Med.* 179 : 1053~1058, 1994.
- 7) Ikehara, S. : Treatment of autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* 29 : 661~669, 2001.
- 8) Ikehara, S., et al. : Long-term observations of autoimmune-prone mice treated for autoimmune disease by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 3306~3310, 1989.
- 9) Doi, H., et al. : Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit^{low}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 2513~2517, 1997.
- 10) Sugiura, K., et al. : Whea germ agglutinin-positive cells in a stem cell-enriched fraction of mouse bone marrow have potent natural suppressor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 4824~4826, 1988.
- 11) Ishida, T., et al. : Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation : complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-lpr/lpr mice by transplantation of bone marrow plus bone (stromal cells) from the same donor. *J. Immunol.* 152 : 3119~3127, 1994.
- 12) Hashimoto, F., et al. : Major histocompatibility complex restriction between hematopoietic stem cells and stromal cells in vivo. *Blood* 89 : 49~54, 1997.
- 13) Takeuchi, K., et al. : A new strategy for treatment of autoimmune diseases in chimeric resistant MRL/lpr mice. *Blood* 91 : 4616~4623, 1998.
- 14) Zhang, Y., et al. : Fate of allogeneic or syngeneic cells in intravenous or portal vein injection : possible explanation for the mechanism of tolerance induction by portal vein injection. *Eur. J. Immunol.* 24 : 1558~1565, 1994.
- 15) Sugiura, K., et al. : Induction of donor-specific T cell anergy by portal venous injection of allogeneic cells. *Immunobiol.* 197 : 460~477, 1997.
- 16) Kushida, T., et al. : Treatment of intractable

- autoimmune diseases in MRL/lpr mice using a new strategy for allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95 : 1862~1868, 2000.
- 17) Kushida, T., et al. : Crucial role of donor-derived stromal cells in successful treatment for intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice by BMT via portal vein. *Stem Cells*. 19 : 226~235, 2001.
- 18) Kushida, T., et al. : Intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells : A powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 97 : 3292~3299, 2001.
- 19) Kushida, T., et al. : A new method for bone marrow cell harvesting. *Stem Cells*. 18 : 453~456, 2000.
- 20) Marmont, A.M. : Immune ablation and stem cell therapy : A new treatment for severe autoimmune disease? *Stem Cells*. 12 : 125~135, 1994.
- 21) Tyndall, A. : Hematopoietic stem cell transplantation in rheumatic diseases other than systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 24 : 94~97, 1997.
- 22) Loske, D.J.L. : Autologous bone-marrow transplantation for rheumatoid arthritis. *Lancet*. 350 : 337~338, 1997.
- 23) Burt, R.K., et al. : Bone marrow transplantation for multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplantation*. 16 : 1~6, 1995.
- 24) van Gelder, M., et al. : Treatment of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in rats with allogeneic bone marrow transplantation from a resistant strain. *Bone Marrow Transplantation*. 16 : 343~351, 1995.
- 25) Karussis, D.M., et al. : Chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR-EAE) : treatment and induction of tolerance with high-dose cyclophosphamide followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J. Neuroimmunol.* 39 : 201~210, 1992.
- 26) Euler, H.H., et al. : Early recurrence or persistence of autoimmune diseases after unmanipulated autoimmune diseases after unmanipulated autologous stem cell transplantation. *Blood*. 88 : 3621~3625, 1996.
- 27) Li, Y., et al. : Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts : A role of stromal cells in positive selection. *Exp. Hematol.* 28 : 950~960, 2000.
-